

トマト果実のグルタミン酸蓄積とエチレンの関係

稲葉 昭次・中務 明・久保 康隆・中村 怜之輔

(生産物利用学講座)

Relationship between Glutamate Accumulation and Ethylene Synthesis in Tomato Fruit during Ripening

Akitsu Inaba, Akira Nakatsuka, Yasutaka Kubo and Reinosuke Nakamura

(Department of Agricultural Products Technology)

The effect of ethylene on the accumulation of glutamate in the fruit of normal tomato ('Rutgers' and 'Momotaro') and ripening inhibitor mutant (*rin*) tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) during ripening was investigated. As fruit ripening progressed, glutamate content in the fruit pericarp tissue increased greatly in 'Rutgers' but remained low and at constant level in *rin* tomato. Glutamine and γ -aminobutyric acid contents decreased gradually during ripening in both 'Rutgers' and *rin* fruit. Relatively high activities of glutamate dehydrogenase, glutamate synthase and glutamine synthetase were detected throughout fruit ripening in both varieties, whereas no relationship was observed between glutamate content and the enzyme activities. Treatment of 'Momotaro' fruit with diazocyclopentadiene, an inhibitor of ethylene action, inhibited the increase in ethylene production and glutamate accumulation which are associated with fruit ripening, suggesting that glutamate accumulation may be mediated through ethylene. However, glutamate content in *rin* fruit treated with exogenous ethylene remained low and unchanged until after four days. The results indicate that accumulation of glutamate in tomato fruit is likely to be related to the ripening process apart from the direct role of ethylene.

Key words : ethylene, glutamic acid, diazocyclopentadiene, tomato, *rin*.

緒 言

トマト果実は、成熟中に多量のグルタミン酸(Glu)を蓄積する。トマトは典型的なクライマクテリック型果実の一つであり、エチレン依存型の成熟現象を示すため、Glu蓄積にエチレンが関与している可能性が考えられる。一方、Gluはいわゆる旨味物質の一つであり⁹⁾、トマト果実の重要な食味構成成分の一つとされているが、食味に対する寄与の程度については不明な点が多い^{3,5)}。トマト果実の成熟中のグルタミン酸の増加様相についての報告は多く、いずれも未熟段階ではごく微量であるものが、成熟の開始

とともに増加し始め、完熟に向けて著しく多量に蓄積するとしている^{3,5,7,8)}。しかし、Gluの蓄積機構については、山中らが一連の研究の中で α -ケトグルタル酸(α -KG) \rightarrow Glu \rightarrow γ -アミノ酪酸(Gaba) \rightarrow コハク酸という一種のTCA回路のバイパス的役割¹³⁾とオキザロ酢酸蓄積による呼吸阻害の除去効果¹⁴⁾を示唆しているにすぎない。

Gluの生合成には2つの経路があり、Glu脱水素酵素(GDH)により α -KGがアミノ化されて生合成されるものと、Glu合成酵素(GOGAT)により

Received October 4, 1994

α -KG とグルタミン (Gln) から生成される経路が存在するとされている。また, Glu は Gln 合成酵素 (GS) の作用によりアンモニア (NH_4^+) を取り込んで Gln に代謝される。さらに, Glu は生体内では他の多くのアミノ酸の生合成に際し, アミノ基供与体として作用している。このように, Glu は植物の窒素代謝において重要な位置を占めているため, 代謝が活発で Glu の蓄積機構を単に含量変化だけで論じるには無理があるように思われる。

そこで, 今回は Glu の蓄積が成熟の進行に起因するものか, あるいはエチレンによって誘導される現象であるものかを知るために, まず最初に通常トマトである 'Rutgers' と非追熟性の突然変異トマトである *rin* を用いて, 追熟に伴う Glu 代謝に関連する酵素活性とアミノ酸含量の変化を比較した。その上で, 通常トマトである, '桃太郎' を用い, エチレンの作用性阻害剤であるジアゾシクロペンタジエン (DACP) 処理と, *rin* に対するエチレン処理を行い, Glu 含量に及ぼす影響を調べた。

材料と方法

材料: トマト (*Lycopersicon esculentum* Mill.) としては, 通常種の 'Rutgers' および '桃太郎' と非追熟性の *rin* を用いた。'Rutgers' は果実の発育特性が *rin* と類似している¹²⁾ため, 比較のためよく用いられる。そこで, 今回も両種を慣行的な栽培方法に従い, 本学圃場のビニールハウス内で育成し, 'Rutgers' がマチュアグリーン (MG) 段階に達した開花後40日で, 両果実とも収穫して実験に供試した。'桃太郎' については玉野市内のハウス水耕栽培のものを MG 段階で収穫して用いた。いずれの実験も, 追熟温度は20°Cとした。

アミノ酸分析と酵素活性の測定: 赤道部の果肉 5 g を -20°C で凍結保存し, 必要時に取り出して 0.1N HCl とともにホモゲナイスし, 10倍に希釈後メンブランフィルターでろ過したものをクエン酸リチュウム緩衝液系のアミノ酸自動分析器 (日本電子, JLC-300) を用いてアミノ酸組成を測定した。アミノ酸分析に用いた同一の果実から赤道部の果肉 5 g を切り出し, Robinson ら¹⁰⁾の方法に従い, GDH, GOGAT および GS の活性変化を 'Rutgers' と *rin* について比較した。活性は, いずれの酵素についてもタンパク質 1 mg 当たりの 1 分間の NADH の変化量または反

応生成物量で表した。

DACP 処理: 収穫直後の MG 段階と 2 日後にターニング (T) 段階まで追熟が進んだ '桃太郎' 果実を 10 L 容のガラス容器内に推定値で $10 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ の DACP ガスとともに密封し, 1 時間 5000 Lux の光照射を行った後, 空気中で追熟させた。光照射に伴う発熱は容器内を冷水を循環させることで防止した。DACP は Regitz と Liedhegener⁹⁾の方法に従って合成し, Sisler と Blankenship¹²⁾の方法を参考にして n-ヘキサン溶液として -20°C で保存して用いた。

エチレン生成量の測定: 果実を 1400 ml 容のプラスチック容器に 1 時間密封し, そのヘッドスペースガス 1 ml を活性アルミナカラムを備えた水素炎検出器付ガスクロマトグラフで分析した。

エチレン処理: 収穫直後の *rin* 果実を 40 L 容のポリエチレン袋内に密封し, 1000 ppm エチレンで 24 時間処理し, その後は空気中で追熟させた。

Table 1 Changes in free amino acid and ammonia contents in the pericarp tissue of 'Rutgers' and *rin* tomato fruits during ripening

Composition	Days after harvest					
	Rutgers			<i>rin</i>		
	0	5	10	0	5	10
Asp	0.30	0.39	1.08	0.48	0.48	0.37
Asn	0.78	0.55	0.51	1.27	0.97	0.81
Glu	0.12	0.88	3.28	0.22	0.33	0.19
Gln	2.91	1.87	1.32	4.81	3.27	3.00
Gaba	1.09	0.60	0.37	2.64	2.37	1.06
NH_4^+	1.39	1.59	0.58	1.62	1.84	2.25

($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)

Table 2 Changes in the activities of glutamate dehydrogenase (GDH), glutamate synthase (GOGAT) and glutamine synthetase (GS) in 'Rutgers' and *rin* tomato fruits during ripening

Enzyme	Days after harvest					
	Rutgers			<i>rin</i>		
	0	5	10	0	5	10
GDH	43.2	25.4	38.5	23.3	33.2	21.3
GOGAT	2.4	1.8	7.0	1.1	1.5	2.4
GS	55.3	49.2	72.4	50.1	45.4	70.3

($\text{nmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)

結 果

追熟に伴うアミノ酸とアンモニア含量の変化

自然追熟中の主要アミノ酸とアンモニア含量を 'Rutgers' と *rin* について比較した (Table 1). いずれの果実ともに遊離アミノ酸としてはアスパラギン酸 (Asp), アスパラギン (Asn), Glu, Gln および Gaba が主要なものであり, その他として NH_4^+ 含量も多かった. 'Rutgers' では, 熟度の進行に伴って Asp と Glu が増加し, Asn, Gln, Gaba および NH_4^+ は減少した. とくに, Glu は10日間の追熟中に27倍にも増加し, 変化程度が最も大きかった. *rin* でも追熟中に多少の増減はみられたが, Glu は低含量のまま変化しなかった.

追熟に伴うグルタミン酸代謝関連酵素の活性変化

GOGAT と GS 活性は, 'Rutgers' および *rin* ともに追熟に伴って増加する傾向を示したが, GDH 活性は 'Rutgers' では一時減少し, *rin* では一時増加する傾向を示した (Table 2). したがって, 追熟に伴う Glu 含量の増加とこれらの酵素活性の変化との間には関連性がみられなかったが, 成熟因子欠損トマトである *rin* でも Glu 合成能は欠失していないようであった.

DACP 処理がエチレン生成とグルタミン酸含量に及ぼす影響

収穫直後の MG 段階と 2 日間追熟させた T 段階の

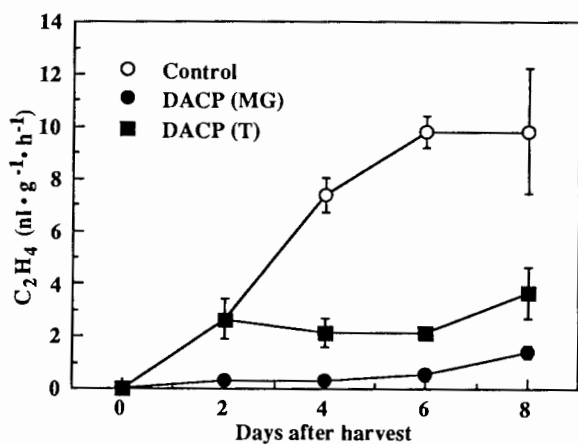


Fig. 1 Effect of DACP on ethylene production in 'Momotaro' tomato fruit during ripening.

Fruit were treated at mature green (MG) or turning (T) stages with $10 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ DACP gas for 1h, and then ripened at 20°C . Vertical bars are SE of the mean of three replications. When absent, the SE bars fall within the dimensions of the symbol.

'桃太郎'果実を DACP 処理し, その後の追熟期間中のエチレン生成量を追跡した. 無処理果実のエチレン生成量は追熟に伴って著しく増加したが, DACP はその増加をほぼ完全に阻害した (Fig. 1). エチレン測定後の果実について Glu 含量を測定したところ, DACP は追熟に伴う Glu の増加もほぼ完全に阻害し, 追熟期間中処理時の含量のままであった (Fig. 2). また, DACP 処理により追熟に伴う他のアミノ酸の増減もほとんど抑制されていた (データ省略).

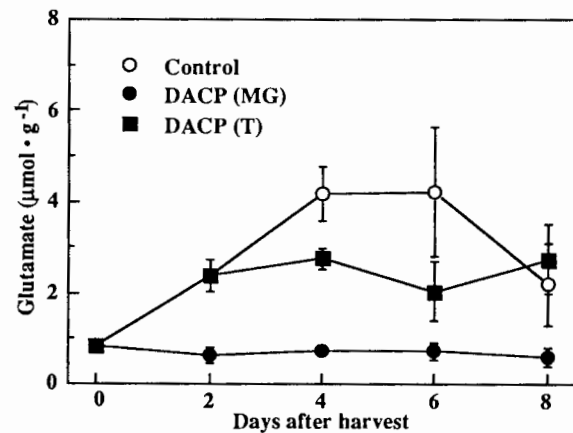


Fig. 2 Effect of DACP on glutamate in 'Momotaro' tomato fruit during ripening.

The same fruit as shown in Fig. 1 were used for glutamate analysis following ethylene measurement. Vertical bars are SE of the mean of three replications. When absent, the SE bars fall within the dimensions of the symbol.

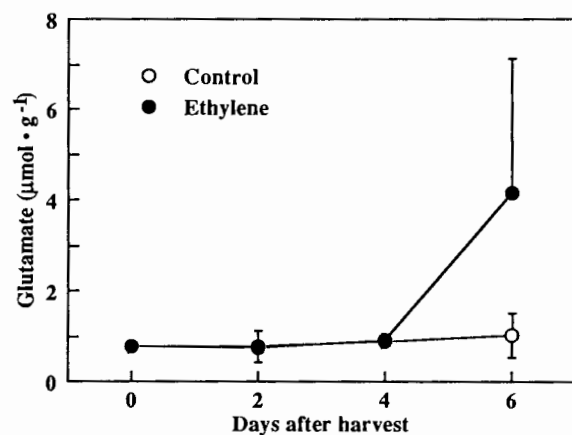


Fig. 3 Effect of ethylene treatment on glutamate content in *rin* tomato fruit during ripening.

Fruit were treated with $1000 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ ethylene for 24h, and then ripened at 20°C . Vertical bars are SE of the mean of three replications. When absent, the SE bars fall within the dimensions of the symbol.

エチレン処理が *rin* 果実のグルタミン酸含量に及ぼす影響

収穫直後の *rin* 果実を1000ppm エチレンで24時間処理したところ、処理直後には Glu 含量の変化はなく6日後になってようやく増加した (Fig. 3).

考 察

'Rutgers' と *rin* トマトを開花後40日で収穫し、その後10日間の追熟中の遊離アミノ酸と NH_4^+ 含量の変化を調べたところ、両品種とも収穫時には Gln, Gaba および NH_4^+ の含量が高く、次いで Asn と Asp が多く、Glu は最も少なかった。追熟に伴って、これらのアミノ酸類は増減し、なかでも 'Rutgers' では Glu の増加と Gaba の減少が著しく、従来の報告^{3,5,7,8)} ともよく一致していた。*rin* でも Gln, Gaba および Asn は 'Rutgers' と同様に追熟に伴って減少したが、Glu はほとんど変化しなかった。*rin* 果実でも追熟中に Glu 含量が通常トマトとほぼ同様に増加するという報告^{7,8)} もあり、今回の結果は異なった傾向を示した。この原因は不明であるが、収穫熟度や追熟温度に起因しているかも知れない。

アミノ酸含量を測定した同一果実について、Glu の合成または代謝に関連する酵素活性を測定したところ、GOGAT と GS 活性は両品種ともに追熟に伴って増加傾向を示したが、GDH 活性は 'Rutgers' では一時減少し、*rin* では一時増加して、その後両品種とも追熟前の値に戻った。山中ら¹³⁾ はトマト '福寿2号' を用いて、Glu を Gaba に代謝する Glu 脱炭酸酵素の活性が追熟に伴い低下することが Glu 蓄積の原因の一つであることを示唆している。今回の実験でも、*rin* 果実では Gaba は追熟中に減少したが、Glu の蓄積は認められなかったので、Glu 脱炭酸酵素の活性低下が Glu 蓄積の直接的な要因とは考えられないように思われる。また、Glu, Asn および Gln などの蓄積は NH_4^+ の解毒的役割としてよく知られており、収穫後のアスパラガスでも GS の阻害剤処理が Asn と Gln を減少させ、逆に NH_4^+ を増加させることが認められている²⁾。本実験でも、'Rutgers' では Glu の増加に伴って NH_4^+ 含量は減少し、Glu の増加がみられない *rin* では追熟中に NH_4^+ が増加する現象がみられたので、Glu の蓄積には NH_4^+ の解毒的役割があるのかも知れない。いずれにしても、Glu はアミノ酸代謝の中心的な物質であるため、代謝が

活発で酵素活性と含量変化が必ずしも一致しないように思われた。

今回実験に用いた *rin* は追熟抑制因子をもつ突然変異種であり、トマト特有の成熟時のエチレン、リコピン および 軟化酵素などの発現がみられない果実¹¹⁾ として知られている。しかし、今回の実験の範囲内では、少なくとも Glu 生成に関する酵素群は欠損していないようであった。このことを踏まえて、Glu 蓄積とエチレンとの関連についてさらに実験を行った。MG 段階の '桃太郎' 果実に DACP 処理を行ったところ、追熟に伴うエチレン生成はみられず、8日間の追熟期間中未熟状態のままであった。さらに、T 段階の処理でも、その後のエチレン生成の増加がほぼ完全に阻害された。これらの果実のエチレン測定後の Glu 含量を調べたところ、DACP 処理により Glu の増加も完全に抑制されていた。このことは、Glu の増加にはエチレンが直接関与していることを示唆しているように思われる。しかし、DACP はエチレンの作用性の強力、かつ永続的な阻害剤であり^{4,12)}、そのためトマトのようなエチレン依存型果実では DACP 処理により成熟の進行そのものが停止し、Glu の蓄積増加も結果的に停止したとも考えられる。また、結果には示さなかったが、DACP は他のアミノ酸の増減もほぼ完全に抑制していた。さらに、本実験の結果とは異なり、エチレン生成能を欠いている *rin* でも Glu は追熟中に増加するという報告例^{7,8)} もあり、DACP 処理による Glu 蓄積の抑制効果は成熟現象の停止によると解釈したほうがよいように思われる。この点を確かめるために、*rin* 果実にエチレン処理を行ったところ、Glu 含量には処理直後の増加は認められず、6日後になってようやく増加した。*rin* 果実もエチレン処理に反応して呼吸のクライマクテリック様の促進がみられる¹¹⁾ ので、エチレンの受容体は存在すると考えられる。したがって、これらのことを総合して判断すると、トマト果実の成熟に伴う Glu の蓄積にはエチレンは直接的には関与していないように思われた。

摘 要

トマト果実の成熟に伴うグルタミン酸蓄積とエチレンとの関係を 'Rutgers', '桃太郎' および *rin* を用いて調べた。

1. 'Rutgers' 果実では、追熟に伴ってグルタミン

酸含量が急激に増加したが、*rin* 果実ではほとんど変化しなかった。グルタミンと γ -アミノ酪酸含量は両果実ともに追熟に伴って減少した。

2. グルタミン酸代謝関連酵素として、グルタミン酸脱水素酵素、グルタミン酸合成酵素およびグルタミン合成酵素の追熟中の活性変化を調べたところ、'Rutgers'および *rin* 果実ともに高い活性を示した。

3. '桃太郎'果実に DACP 処理すると、追熟の進行に伴うエチレン生成の増加が抑制され、同時にグルタミン酸の蓄積も処理熟度の状態で停止した。

4. *rin* 果実に対するエチレン処理はグルタミン酸の蓄積を誘導しなかったが、6日後には増加した。

5. 以上のことより、トマト果実の成熟に伴うグルタミン酸の蓄積はエチレン生成によるものではなく、成熟の進行に伴う現象であるように思われた。

謝 辞

本研究の一部は、平成4年度文部省科学研究費補助金総合研究(A)-04304014によった。トマトの栽培にあたっては、本学農学部柘田正治教授の協力を、DACPの合成にあたっては、馬場直道教授の指導を得た。記して感謝の意を表す。

文 献

- 1) Herner, R.C. and K.C. Sink, Jr : Ethylene production and respiratory behavior of the *rin* tomato mutant. *Plant Physiol.*, **52**, 38-42 (1973)
- 2) Hurst, P.L., G.A. King and W.M. Borst: Postharvest inhibition of glutamine synthetase activity with phosphinothricin reduces the shelf-life of asparagus, *Postharvest Biol. Technol.*, **3**, 327-334 (1993)
- 3) 稲葉昭次・山本 努・伊東卓爾・中村怜之輔: トマト果実の樹上成熟及び追熟中の遊離アミノ酸と可溶性ヌクレオチド含量の変化. *園芸学会雑誌*, **49**, 435-441 (1980)
- 4) Inaba, A., T. Manabe, H. Tsuji and T. Iwamoto : Electrical impedance analysis of tissue properties associated with ethylene induction by electric currents in cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit. *Plant Physiol.*, in press
- 5) Kader, A.A., M.A. Stevens, M. Albright and L.L. Morris : Amino acid composition and flavor of fresh market tomatoes as influenced by fruit ripeness when harvested. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **103**, 541-544 (1978)
- 6) Kawamura, Y. and B.P. Halpern : Recent development in umami research. in *Umami : A Basic Taste* (Kawamura, Y. and Kare, M.R. eds.), pp. 637-642, Marcel Dekker, New York (1987)
- 7) 澤野 稔・水野 進・小机信行: トマト果実の追熟に及ぼす追熟抑制因子 (*rin*) の影響. *園芸学会雑誌*, **53**, 79-86 (1984)
- 8) 永田雅靖・西條了康: トマト果実の成熟に伴う遊離アミノ酸含有量の変化, とくにグルタミン含有量の変動について. *日本食品工業学会誌*, **39**, 64-67 (1992)
- 9) Regitz, M. und A. Liedhegener : Reaktionen aktiver methylenverbindungen mit aziden-XV : Synthese von diazocyclopentadienen durch diazogruppenübertragung und einige reaktionen. *Tetrahedron*, **23**, 2701-2708 (1967)
- 10) Robinson, S.A., A.P. Slade, G.G. Fox, R. Phillips, R.G. Ratcliffe and G.R. Stewart : The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiol.*, **95**, 509-516 (1990)
- 11) Tigchelaar, E.C., W.B. McGlasson and R.W. Buescher : Genetic regulation of tomato fruit ripening. *HortScience*, **13**, 508-513 (1978)
- 12) Sisler E.C. and S.M. Blankenship : Diazocyclopentadiene (DACP), a light sensitive reagent for the ethylene receptor in plants. *Plant Growth Reg.*, **12**, 125-132 (1993)
- 13) 山中博之・茶珍和雄・緒方邦安: トマト果実の貯蔵とアミノ酸代謝に関する研究(第3報) トマト果実におけるグルタミン酸および γ -アミノ酪酸の代謝. *園芸学会雑誌*, **41**, 317-321 (1972)
- 14) 山中博之・茶珍和雄・緒方邦安・小林省蔵: トマト果実の貯蔵とアミノ酸代謝に関する研究(第4報) トマト果実のミトコンドリアにおける呼吸調節とくにグルタミン酸-オキザロ酢酸トランスアミナーゼについて: *園芸学会雑誌*, **43**, 199-206 (1974)